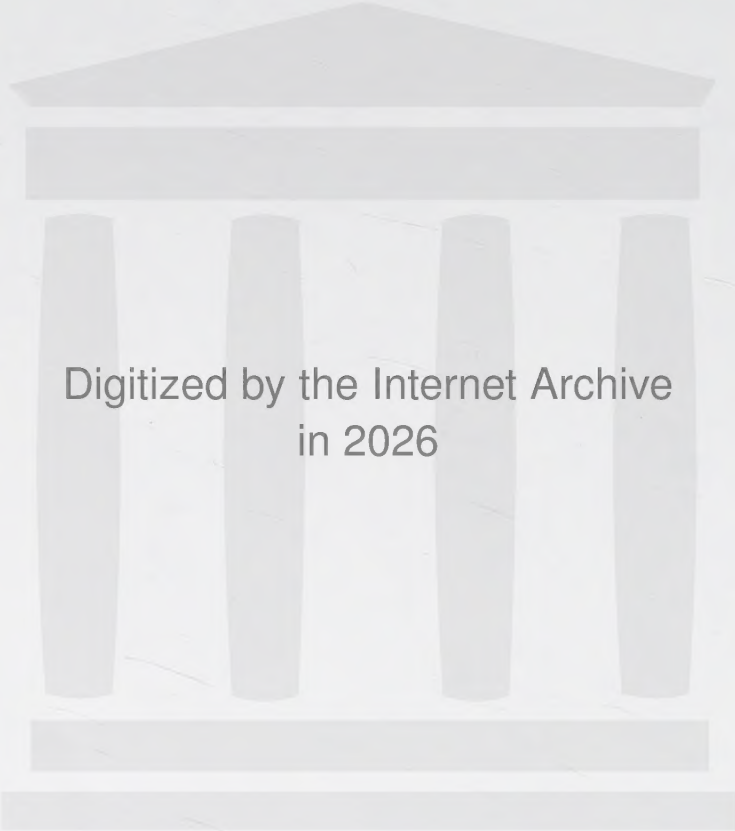


**Einfluß von Antibiotika auf die
Phagozytose von
Mäuse-Peritonealmakrophagen in vitro**

Prosper Philipp

—
1974
—



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551921_0076

Aus der Kinderklinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. K. Betke

Einfluß von Antibiotika auf die Phagozytose von
Mäuse - Peritonealmakrophagen in vitro

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig - Maximilian - Universität zu München
vorgelegt von

Prosper Philipp
aus Meersburg

München 1974

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: .Priv.-Doz. Dr. Dr. D. Adam.....

Mitberichterstatter: .Prof. Dr. K. Beke.....

Dekan: .Prof. Dr. W. Spann.....

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.1974.....



Herrn Prof. Dr. med. W. Marget bin ich für die Überlassung des Themas und für wertvolle Hinweise zur Gestaltung der Arbeit zu Dank verpflichtet.

Herrn Priv. Doz. Dr. med., Dr. rer. nat. D. Adam möchte ich für seine Anleitung zur Durchführung der Arbeit, kritische Betreuung und unermüdliche Hilfe besonders herzlich danken.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
Die körpereigene Abwehr	2
Antibiotika	5
Material und Methoden	10
Versuchsordnung	17
Ergebnisse	24
Diskussion	33
Zusammenfassung	44
Tabellen	45
Abbildungen	50
Bilder	58
Literaturverzeichnis	63

Einfluß von Antibiotika auf die Phagozytose von Mäuse - Peritonealmakrophagen in vitro

Im Säugetierorganismus spielen Makrophagen als Teil der Immunität des Körpers bei der Abwehr pathogener Keime eine wesentliche Rolle.

Auch Antibiotika sind wichtige therapeutische Mittel, mit deren Hilfe pathogene Erreger bekämpft werden können. In dieser Arbeit soll ein möglicher Einfluß von Antibiotika auf die Funktion der Makrophagen untersucht werden.

Zunächst seien einige Bemerkungen über Makrophagen als Teil der körpereigenen Abwehr und über Antibiotika als antibakterielle Substanzen vorangestellt.

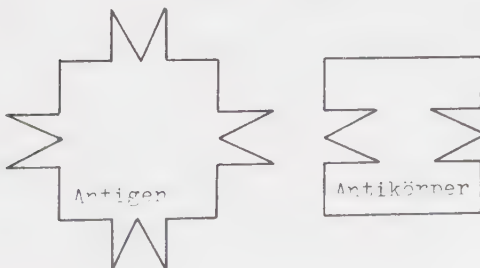
Die körpereigene Abwehr

Die Immunität des Säugetierorganismus drückt sich in einer Vielzahl komplexer Vorgänge und Reaktionen aus, die teilweise noch nicht vollständig bekannt sind. Sie ist einer der wichtigsten Faktoren, die es dem Organismus ermöglicht, inmitten einer großen Zahl von Bakterien, Viren und Pilzen zu überleben, von denen viele die Körperzellen für ihr eigenes Wachstum und für ihre Vermehrung benutzen können, und deren Stoffwechselprodukte häufig für den Säugetierorganismus schädlich sind.

Andererseits ist der differenzierte, vielzellige und langlebige Wirbeltierorganismus ständig bedroht, in seiner komplizierten Zusammensetzung durch Mutationen, die spontan auftreten oder durch äußere Einflüsse bewirkt sein können, aus dem Gleichgewicht gebracht zu werden. Durch den falschen Einbau nur einer Aminosäure in ein Protein kann ein Enzym wirkungslos werden und der Organismus in eine verhängnisvolle Lage kommen.

So kommt dem Immunsystem als Abwehrorgan gegen Mikroorganismen wie gegen durch Mutation im eigenen Organismus entstandene "fremde" Zellen große Bedeutung zu. Dieses System kann körperfremde Stoffe identifizieren und durch sein spezifisches Instrument, die Antikörper, binden und somit unschädlich machen.

Im Gegensatz zu vielen Organen, die im Körper an bestimmten Stellen lokalisiert sind, ist das Immunsystem ubiquitär im Organismus verteilt. Gehäuft jedoch findet es sich in den lymphatischen Organen, und zwar in Thymus, Bursa Fabricii, Tonsillen, Appendix, Milz, Lymphknoten, Lymphfollikel sowie im Knochenmark, Blut und Bindegewebe. Der zelluläre Anteil des Immunsystems wird hauptsächlich von Makrophagen, Lymphozyten und Plasmazellen gebildet. Makrophagen nehmen das Antigen durch Phagozytose auf, Lymphozyten und Plasmazellen bilden spezifische Antikörper. Der Wirkungsmechanismus des Immunsystems ist die Antigen-Antikörperreaktion. Durch spezifische Oberflächenstrukturen sind die Antikörper in der Lage, das Antigen zu binden und auszufällen. Schematisch wird dies durch die Form eines Schlüssels, der in ein bestimmtes Schloß passt, dargestellt (10).



Wenn der Organismus mit einem Antigen in Berührung gekommen ist, nehmen Makrophagen reichlich Antigen auf und zahlreiche kleine Lymphozyten durchwandern das Gewebe an der betreffenden Stelle. Daraufhin wird eine starke Proliferation der gesamten Mesothelzellen beobachtet. Es konnte nachgewiesen werden, daß es sich nicht um Einwandern sondern um Zellteilung handelt, die wahrscheinlich durch das Antigen stimuliert wurde (11). Etwas später findet man Zellhaufen aus Lymphozyten, die sich um einzelne Makrophagen gelagert haben. Es konnte ein Undulieren der Makrophagenmembran beobachtet werden, die dabei in innigen Kontakt mit den Lymphozyten tritt. Es wird angenommen, daß hierbei Information über das Antigen, sogenanntes "Superantigen" an die Lymphozyten übergeben wird (30). Nach einiger Zeit kann man aus diesen Zellhaufen antikörperproduzierende Zellen isolieren (11).

Manchmal wurde die Vermutung ausgesprochen, daß Makrophagen Antikörper produzieren. Neuere Untersuchungen konnten diese Theorie jedoch mit Sicherheit widerlegen (27).

Demnach kommt den Makrophagen beim Ablauf einer Immunreaktion eine wesentliche Bedeutung zu.

Antibiotika

Bei der Therapie der von Mikroorganismen verursachten Infektionskrankheiten verwendet man heute mit guten Erfolgen Chemotherapeutika als antibakteriell wirkende Substanzen. Ursprünglich verstand man unter Antibiotika Stoffe, die in der Natur als Produkte von Tieren und Pflanzen gefunden werden, während als Chemotherapeutika synthetisch hergestellte chemische Substanzen bezeichnet wurden. Da heute jedoch auch Antibiotika ganz oder teilweise synthetisiert werden, ist diese Einteilung überflüssig geworden.

In ihrer Wirkung unterscheidet man bakterizide und bakteriostatische Mittel. Bakterizide Chemotherapeutika stören die Biosynthese der Bakterienwand, wodurch die Keime den feindlichen Umwelteinflüssen ausgesetzt werden. Dies hat ein Absterben der Mikroorganismen zur Folge. Da die Zellwände nur während der Vermehrungsphase aufgebaut werden, ist die Wirkung bakterizider Mittel auf diese Phase beschränkt. Allerdings beeinflussen manche bakteriziden Mittel die Zytoplasmamembran, indem sie deren Permeabilität ändern. Sie sind daher auch in der Ruhephase der Keime wirksam. Bakteriostatika dagegen hemmen die Proteinsynthese und die Stoffwechselvorgänge der Keime, wodurch diese in Wachstum und Vermehrung gehemmt werden.

Antibiotika wirken nicht gleichmäßig auf alle Mikroorganismen,

sondern meist nur gegen bestimmte Bakteriengruppen, während andere Keime gegen dieses Mittel weitgehend resistent sind. Jedoch können viele Keime sekundär eine Resistenz gegen das verwendete Antibiotikum entwickeln. Dabei handelt es sich wahrscheinlich nicht um spontan auftretende Mutationen, sondern um die starke Vermehrung vorher schon vorhandener resistenter Untergruppen, die sich durch das Ausschalten der empfindlichen Mikroorganismen ungestört entfalten können.

Bei der Beurteilung eines Antibiotikums für die Therapie sind wichtige Punkte zu beachten, so vor allem die Auswahl eines wirksamen Chemotherapeutikums gegen den vorliegenden Keim, die Bestimmung der notwendigen Konzentration des Mittels, die Berücksichtigung von Faktoren, die die Konzentration im Körper herabsetzen können, z. B. die Eiweißbindung des Mittels, die Diffusionsrate ins Gewebe, die Inaktivierungs und Abbauprozesse im Organismus und die toxischen Nebenwirkungen, die bei der Applikation auftreten können.

Eine weitere wichtige Frage, die in diesem Zusammenhang auftaucht, ist die Beeinflussung der Immunitätsentwicklung des Organismus durch die Chemotherapie. Werden durch die Antibiotika die Faktoren der körpereigenen Abwehr unterstützt oder gehemmt? Diese Frage ist von verschiedenen Autoren aufgeworfen und in speziellen Fällen untersucht worden.

In einer Arbeit wurde auf den Zusammenhang zwischen der Höhe des Antistreptolysintiters bei scharlachkranken

Kindern und dem Beginn einer Penicillinbehandlung hingewiesen. Während unbehandelte Kinder einen steilen Titeranstieg zeigten, erhöhte sich bei den Patienten, die rasch einer Antibiotikatherapie unterzogen wurden, der Antistreptolysintiter nur langsam und schwach und fiel rasch wieder ab. Aus diesen Ergebnissen schloß man, daß durch das rasche Einsetzen der Antibiotikatherapie die Erreger schnell abgetötet werden, und der Organismus keine Gelegenheit hat, sich mit den Keimen auseinanderzusetzen, das heißt, daß sich keine wirkungsvolle Immunität entwickeln kann (31).

Ebenso wurde bei Typhus der Erfolg einer antibiotischen Behandlung mit Chloramphenicol untersucht (13). Das Ergebnis zeigte, daß Rückfälle umso häufiger waren, je eher die Antibiotikatherapie eingeleitet worden war. Daraus wurde wiederum geschlossen, daß durch die Chemotherapie die Keime zu schnell abgetötet werden und der Organismus daher keine Gelegenheit mehr hat, eine eigene Abwehr, das heißt einen hohen Antikörperspiegel, aufzubauen. Untersuchungen ergaben ferner, daß seit Einführen der Antibiotikatherapie rezidivierende Pneumonien zugenommen haben, wofür als Ursache eine ungenügende Bildung von Antikörpern gegen den Erreger infolge frühzeitiger Keimabtötung nachgewiesen werden konnte (5).

Während diese Ergebnisse auf eine antagonistische Beeinflussung von Antibiotikatherapie und körpereigener Abwehr schließen lassen, gibt es andererseits auch Argumente da-

für, daß sich beide Faktoren bei der Bekämpfung von Mikroorganismen unterstützen. So ist aus klinischen Beobachtungen bekannt, daß Antibiotikabehandlung auch da zum Ziele führt, wo aus anatomischen und physiologischen Gründen nur eine viel schwächere als die in vitro für notwendig festgestellte Konzentration erreicht werden kann, so z. B. im Knochen, der nur sehr schwach durchblutet wird und daher von Antibiotika nur in unerschwelligen Dosen erreicht werden kann (32). Chemotherapie bleibt oft trotz höchster verabreichter Dosen erfolglos, etwa bei Infektionen in künstlich eingelegten Spitz - Holter Ventilen bei Kindern mit Hydrocephalus (18). Da in diesen künstlichen Teilen eine körpereigene Abwehr nicht vorhanden ist, besteht der Verdacht, daß das Fehlen von immunkompetenten Zellen für das Versagen der Antibiotikatherapie verantwortlich gemacht werden muß. Eine andere Beobachtung, die in die gleiche Richtung weist, ist die, daß bei Kranken mit Immundefizienzen die Patienten meist trotz stärkster verabreichter Antibiotika ihren Infektionen erliegen. Ebenso wird bei Patienten, die nach Organtransplantationen mit Immunsuppressiva behandelt werden, die Abwehr sonst harmloser Infektionen mit Antibiotika schwer (26). Wie in den vorangehenden Erläuterungen und Beispielen dargestellt wurde, spielen beide, die körpereigene Abwehr wie auch die Chemotherapie, eine wichtige Rolle

in der Abwehr pathogener Keime im befallenen Organismus. Dennoch wurden diese beiden Faktoren meist völlig isoliert voneinander betrachtet. Die Auswahl und Dosierung eines Antibiotikums wurde nach Untersuchung dessen Wirkung auf den betreffenden Bakterienstamm in vitro vorgenommen, das Zusammenwirken mit anderen Teilen des Organismus blieb oft unbeachtet.

Es erhebt sich also die wichtige Frage, in wieweit eine Beziehung bzw. eine gegenseitige Beeinflussung von Antibiotika und Faktoren der körpereigenen Abwehr besteht. In dieser Arbeit soll der Einfluß von Antibiotika auf Makrophagen, also den afferenten Teil der Immunreaktion, untersucht werden. Dabei wurde sowohl die Aufnahme von Bakterien, die Phagozytose, wie auch das intrazelluläre Abtöten der Keime, die bakterizide Wirkung, untersucht, wenn gleichzeitig unterschwellige Dosen von Antibiotika gegeben werden. Unterschwellige Dosen von Chemotherapeutika allein haben keinen Einfluß auf die Vermehrung und das Wachstum von Bakterien. In wieweit jedoch durch sie die Makrophagenfunktion gehemmt oder unterstützt wird, diese Frage sollte durch die Arbeit untersucht werden.

Material und Methoden

Mäuse: Makrophagen wurden aus weißen Mäusen isoliert, da es verhältnismäßig einfach ist, aus diesen Tieren eine nur mit wenigen anderen Zellen verunreinigte Suspension von Peritonealmakrophagen zu gewinnen (8, 28, 33). Es wurden weibliche Mäuse vom NMRI Stamm verwendet, die zur Zeit der Versuche etwa 35 - 40 g wogen. Die Tiere erhielten Standarddiät Altromin^R und Wasser ad libitum.

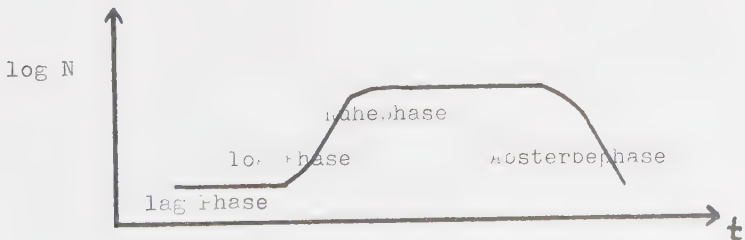
Bakterien: Als Keime verwendeten wir *Escherischia Coli* O 18, die von Dr. F. Ørskov in Kopenhagen bezogen worden waren.

Wird eine Bakterieneinsaat in ein geeignetes frisches Nährmedium gegeben und bei einer für den Stamm optimalen Temperatur gehalten, so liegen im wesentlichen gute Wachstumsbedingungen vor. Dennoch bleibt die Keimzahl zunächst noch einige Zeit unverändert. Es handelt sich dabei um einen einleitenden Abschnitt des Populationswachstums, der als Anlaufphase (lag Phase) bezeichnet wird. Nach einiger Zeit beginnen sich die Keime mit zunehmender Geschwindigkeit zu teilen. Man bezeichnet dies als Beschleunigungsphase (Akzelerationsphase). Hierbei steigt die Wachstumsgeschwindigkeit von Null auf einen Maximalwert an. Diese Phase leitet in die Hauptphase des Wachstums über, welche konstante Wachstumsgeschwindigkeit zeigt. Es ist dies die Phase

des exponentiellen wachstums oder die "log Phase". In unserem Schaubild wird sie durch eine Gerade mit einem bestimmten Anstieg dargestellt.

Durch Erschöpfung der zur Verfügung stehenden Nährstoffe und die Anhäufung der Stoffwechselprodukte entsteht eine Übergangsphase mit abnehmender Wachstumsgeschwindigkeit, die als Verlangsamungsphase oder Retardierungsphase bezeichnet wird. Daran schließt sich eine Phase ohne Zellvermehrung, die Ruhephase oder stationäre Phase, an.

Allerdings handelt es sich hierbei nicht um einen echten Ruhe-, sondern um einen dynamischen Gleichgewichtszustand, in dem sich Proliferation und Absterben der Keime die Waage halten. Das sieht man daran, daß sich auch in dieser Phase Resistenzen gegen bestimmte Antibiotika entwickeln können. In dieser Phase weisen Kulturen unabhängig von der ursprünglichen Einsaat eine konstante Bakterienkonzentration auf. Daher verwendet man solche kulturen für bakteriologische Einsaaten. Nach längerer Zeit setzt mehr oder weniger rasch eine Abnahme der Zahl lebender Keime ein, die in die Absterbephase überleitet (25).



Bakterienwachstum im Diagramm (N = Anzahl der Keime)

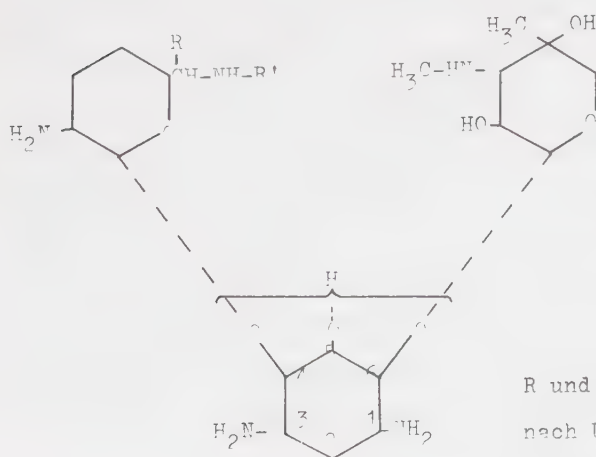
Um während des Versuches eine synchron wachsende Kultur, das heißt Keime in möglichst gleichem Zustand zu haben, wurde folgendermaßen vorgegangen:

Mit einer ausgeglühten Platinöse wurden einige Kolonien des Stammes von der Platte in 10 ml Brain - Heart - Infusion - Broth (BHIB) überimpft. Die Keime wurden in dieser Lösung 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Suspension mit dem gleichen Medium 1:10 verdünnt und 1 Stunde in einem Wasserbad bei 37°C bebrütet. Um jedes weitere Bakterienwachstum abzustoppen wurde die Suspension darauf zehn Minuten in einem Eisbad abgekühlt. Die so erhaltene Bakteriensuspension wurde mit einem Photometer (Coleman Spectrophotometer Model Junior 6/20) bei einer Wellenlänge von 650 nm mit BHIB auf eine optische Dichte von 0,15 verdünnt. Dies entspricht einer Keimmenge von etwa 10^8 Keimen pro Milliliter. Diese Zahl war durch vergleichende Untersuchungen mit Auszählen von Kolonien auf der Platte ermittelt worden. Auf diese Weise konnte in allen Versuchen mit annähernd gleichen Bakterienkonzentrationen gearbeitet werden.

Antibiotika: Als Antibiotika dienten Pol-myxin B und Gertamycin. Lösungen dieser Substanzen wurden bis zur Verwendung in kleinen Mengen bei -20°C aufbewahrt. Bei beiden Antibiotika handelt es sich um Präparate mit begrenztem Wirkungsbereich, die vorwiegend gegen gramnegative Bakterien, z. B. Escherichia Coli wirksam sind. Polymyxin B wurde von Chas. Pfizer + Co in Karlsruhe bezogen. Es gehört in die Gruppe der Polypeptid - Antibiotika.

Chemisch handelt es sich um ein basisches zyklisches Peptid - Antibiotikum. Es besteht aus den Bausteinen L - α , γ -Diaminobuttersäure, L - Threonin, D - Leuzin, D - Phenylalanin, 6 Methyl - Oktansäure und hat die Summenformel $C_{56} H_{96-98} O_{13} N_{16}$. Es liegt als Sulfat vor. Polymyxin ist ein Bakterioostatikum, allerdings wirkt es in höheren Dosen auch bakterizid. Da es die Zytoplasmamembran der Keime beeinflusst wirkt es nicht nur im Proliferationsstadium sondern auch in der Ruhephase der Bakterien. Durch Beeinflussung der Zytoplasmamembran werden deren Permeabilität sowie die aktiven und passiven Transportmechanismen gestört, sodaß die in Lösung befindlichen Zellkomponenten ausfließen können (32a).

Gentamycin (Refobacin^R) wurde von E. Merck in Darmstadt bezogen. Es gehört in die Gruppe der Aminoglykosid - Antibiotika mit folgender Strukturformel (32b):



R und R' können je
nach Untergruppe ein
CH₂ Radikal oder ein
H Atom sein

Die genaue Wirkungsweise von Gentomycin ist nicht bekannt. Man nimmt an, daß es bei proliferierenden Keimen durch Stören der Proteinsynthese wirkt, also ein Bakteriostatikum ist. Allerdings hat es in höheren Dosen auch bakterizide Wirkung.

Medium: Eagle's Minimum Essential Medium, das von den Behring Werken, Marburg / Lahn bezogen wurde, diente als Nährmedium für die Makrophagen. Vor den Versuchen wurde je 0,07 ml Natriumbikarbonatlösung in 10 ml Medium zugegeben, um einen konstanten pH Wert von 7,2 bis 7,4 zu gewährleisten. Diesem pH entspricht ein orangeroter Farbton des im Medium vorhandenen Indikators.

Serum: Sämtliche in den Versuchen verwendete Seren waren vorher 30 min in einem Wasserbad auf 56°C erhitzt und so inaktiviert worden.

Wir verwendeten spezifisches Anti Coli O 18 Kaninchenserum. Um dieses gewinnen zu können, immunisierten wir zwei Kaninchen mit einem spezifischen E. Coli O 18 Antigen, das folgendermaßen hergestellt worden war:

Einige Kolonien des Stammes wurden über Nacht auf Agar-Platten angebrütet und am nächsten Tag vorsichtig mit physiologischer Kochsalzlösung mittels Wattetupfer abgeschwemmt. Die Suspension wurde zentrifugiert und dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Danach wurde das Sediment mit physiologischer Kochsalzlösung auf mittlere Dichte aufgeschwemmt. Nachdem die Keime eine Stunde bei 100°C abgetötet worden waren, lag injektionsfertiges Antigen vor.

Die Kaninchen wurden immunisiert, indem man am

1. Tag 1ml

6. Tag 2 ml

11.Tag 4 ml Antigen in die Ohrvenen injizierte. Am 16.

Tag entnahmen wir den Tieren Blut. Nach einigen

Monaten wurden die Kaninchen durch erneute Injektion

von 5 ml E. Coli O 18 Antigen geboostert und sechs

Tage später entblutet.

Außerdem benutzten wir Serum eines nicht immunisierten

Kaninchens. Daneben wurde ein Rinderserum der Behring

Werke, Marburg/Lahn, sowie foetales Kälberserum der

DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan (USA), verwendet.

In einer Versuchsreihe testeten wir Humanserum von zwei
gesunden Spendern.

Von allen Seren ermittelten wir den indirekten Hämagglu-

tinationstiter nach der Methode von Neter (23). Die

verschiedenen Seren hatten folgende Antikörpertiter

gegen Escherichia Coli O 18:

Serum vom immunisierten Kaninchen	1:5620
-----------------------------------	--------

Serum vom nicht immunisierten Kaninchen	1:80
---	------

Humanserum I	1:5620
--------------	--------

Humanserum II	1:20
---------------	------

Rinderserum	1:320
-------------	-------

Foetales Kälberserum	1:80
----------------------	------

Glas: Als Versuchsröhrchen dienten sogenannte "Leighton-tubes". Es handelt sich dabei um Reagenzgläschen, bei denen auf einer Längsseite der Boden flach ausgezogen ist. Diese Fläche wird vollkommen von einem eingelegten dünnen

Deckgläschen bedeckt. Die Kulturröhrchen wurden gründlich gereinigt, fünf mal mit destilliertem Wasser gespült und nach Verschließen mit einer Abziehkappe sterilisiert.

Versuchsanordnung:

Bei der Untersuchung der Phagozytose und der bakteriziden Wirkung der Makrophagen bedienten wir uns einer Methode, wie sie im Wesentlichen schon von anderen Autoren beschrieben worden ist (8,28).

Zur Gewinnung der Makrophagen wurden die Mäuse durch Genickbruch getötet und mit dem Bauch nach oben auf einer Styroporplatte aufgespannt. Die Bauchhaut wurde unter sterilen Kautelen mit Schere und Pinzette von kaudal nach kranial eröffnet und seitlich weggeklappt. Danach wurden mittels einer Injektionsspritze 2 ml Eagle's Medium, das 5 IE/ml Heparin enthielt, in die Bauchhöhle injiziert (Bild 1). Es war darauf zu achten, daß keine Darmschlingen angestochen wurden. Sofort anschließend wurde aus einem seitlichen Teil der Bauchhöhle etwa 1,5 ml der Zellsuspension mit einer Spritze entnommen und in ein Kölbchen gegeben, das, um ein Festsetzen der Zellen auf Glas zu verhindern, auf einer Schüttelmaschine leicht bewegt wurde. In gleicher Weise wurden Makrophagen von mehreren Mäusen für einen Versuch entnommen, die Zellsuspensionen wurden gepoolt, um für alle Versuchsansätze gleiche Makrophagenkonzentrationen zu erreichen. Seltene blutige Punktionen wurden verworfen, um die Makrophagen-suspension nicht durch Blutzellen zu verunreinigen. Die Suspension wurde mit 20% inaktiviertem Rinderserum versetzt.

Die Bestimmung der Zellzahl der Makrophagensuspension wurde in einer Neubauerkammer unter dem Phasenkontrastmikroskop vorgenommen. Die Norm lag zwischen 2 und 5×10^6 Zellen / ml Suspension. 90% dieser Zellen sind Makrophagen (28).

Einige besondere Versuche führten wir mit Makrophagen durch, die wir aus Milzen gewannen. Zur Isolierung der Milzmakrophagen bedienten wir uns einer beschriebenen Methode (9). Zunächst wurde die Milz des getöteten Tieres unter sterilen Bedingungen entnommen und in kleine Stücken geschnitten, die vom Bindegewebe der Milzkapsel befreit waren. Sie wurden daraufhin dreimal in "Hanks Balanced Salt Solution" gewaschen um Blut weitgehend aus dem Gewebe zu entfernen. Die Milzmakrophagen sind gewebsständig und können durch Trypsin aus dem Gewebsverband gelöst werden. Dazu wurde eine 25%ige Trypsinlösung benutzt, die durch Zugabe von 5%iger Natriumbicarbonatlösung auf einen pH von 7,2 - 7,4 eingestellt worden war. Das Gefäß mit Lösung und Milzstücken wurde auf einer Schüttelmaschine sanft bewegt, um ein Festsetzen der Zellen zu verhindern. Nach zehnmminütigem Zentrifugieren bei 400 UPM hatten sich die Zellen am Boden abgesetzt, sodaß der Überstand dekantiert werden konnte. Die Makrophagen wurden in "Hanks Balanced Salt Solution" resuspendiert. Um die Zellen zu waschen, wurde dreimal zentrifugiert und resuspendiert. Unter dem Mikroskop wurde die Zellzahl bestimmt, durch geeignete Verdünnung eine Suspension von 5×10^5 Zellen hergestellt.

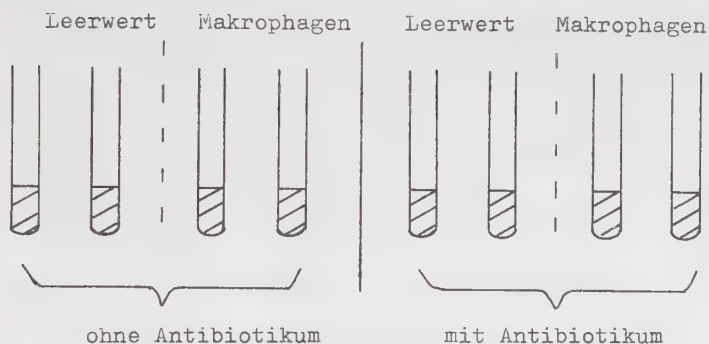
In sterile Leighton tubes wurde je 1 ml der Zellsuspension einpipettiert und bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Zur Untersuchung der Phagozytose bedienten wir uns der Fähigkeit von Makrophagen, auf Glas fest-sitzende Zellfilme zu bilden. Die Makrophagen sedimentieren auf die Deckgläschen und haften dort nach einiger Zeit fest an (14). Da sich auch Granulozyten auf Glas festsetzen, wählten wir eine längere Sedimentationszeit, denn Granulozyten überleben in vitro nur kurze Zeit (14). Durch eine etwa 18stündige Sedimentationszeit konnten wir auf den verwendeten Gläschen eine fast reine Kultur monozytärer Zellen vorfinden.

Einige dieser Makrophagenfilme wurden auf den Gläschen mit Methanol fixiert und 30 min mit 2,5 %iger Giemsa-lösung gefärbt, danach kurz mit aqua destillata abgewaschen und an der Luft trocknen gelassen. Danach war eine Betrachtung unter dem Mikroskop möglich. Die Makrophagen zeigen sich dabei als große Zellen mit einem Durchmesser bis zu 30 μ , mit rundem bis ovalem Kern der stark gefärbt ist und mit schaumig erscheinendem Zytoplasma mit zahlreichen Vakuolen. Die Zellen sind mit langen Fortsätzen auf dem Glas ausgebreitet (Bild 2).

Nach der Entnahme der mit Makrophagen behafteten Deckgläschen befanden sich meist noch etwa die Hälfte der anfänglich vorhandenen Zellen in Suspension. Die

Deckgläschen waren also annähernd mit der gleichen Anzahl von Makrophagen besetzt. Wahrscheinlich handelt es sich bei den in Suspension verbleibenden Zellen um tote Makrophagen, da das Sedimentieren auf Glas ein Ausdruck der Phagozytosefähigkeit ist (24). In Vorversuchen wurde mit aufsteigenden Konzentrationen die niedrigste Antibiotikummenge ermittelt, die im Stande war, Keimwachstum in Suspension zu hemmen. In unseren Versuchen wurden dann unterschwellige Konzentrationen verwendet, also Dosen, die das Wachstum der Bakterien nicht mehr zu hemmen vermögen. Sie lagen in diesen Versuchen bei 0,2 µg Polymyxin und 0,8 µg Gentamycin pro ml. In einem Versuchsansatz wurde die Hälfte der Kulturröhrchen mit einer Bakteriensuspension mit Antibiotikum, die andere Hälfte ohne Antibiotikum angesetzt. Die Gesamtmenge in jedem Röhrchen betrug 1 ml. Da die Phagozytose durch Vergleich der Keimzahlen des Röhrchens mit Makrophagen mit einem solchen ohne Zellen ermittelt werden sollte, wurden Leerwerte mit genau gleicher Keimzahl aber ohne Makrophagen angesetzt, die zur Hälfte Antibiotikum, zur anderen Hälfte kein Antibiotikum enthielten. Da die Versuche durch Auszählen der Keimzahlen ausgewertet werden mußten und die Werte wie bei allen biologischen Versuchen starken Schwankungen unter-

worfen sind, wurde jeder Versuch doppelt angesetzt.
Der Aufbau eines Versuches sah folgendermaßen aus:



Um Keimvermehrungen zu vermeiden, wurden alle Arbeiten wie z. B. das Einpipettieren der Keime und des Antibiotikums sowie das Einimpfen in die Kulturröhrchen im Eisbad vorgenommen.

Nach Vorbereitung der Röhrchen wurden die Deckgläschen mit dem Makrophagenfilm eingelegt. Dazu wurde es mit einer ausgeglühten Zahnpinzette aus dem Kulturröhrchen, in dem die Makrophagen sedimentiert waren, herausgenommen (Bild 3), in steriler physiologischer Kochsalzlösung vorsichtig gewaschen, um anhaftende tote Zellen und Verunreinigungen zu entfernen, und dann in die Röhrchen mit der vorbereiteten Bakterien-

suspension eingegeben. Die Röhrchen kamen, zusammen mit den Leerwerten, in einen Brutschrank mit 37°C. Wir wählten eine Inkubationszeit von 70 Minuten, da danach eine gute Phagozytose nachweisbar war, ohne daß sich die Keime schon wesentlich vermehrt hatten (8). Um sofort jede Zellaktivität und Keimvermehrung zu stoppen, wurden die Röhrchen nach Ablauf dieses Zeitraums in ein Eisbad gestellt. Die jetzt in den Suspensionen vorhandenen Keimzahlen wurden ermittelt, indem aus jedem Röhrchen 0,1 ml auf eine Endo - Agar Platte pipettiert und ausgestrichen wurde.

Daneben wurde die Zahl der phagozytierten lebenden Keime bestimmt. Dazu wurde das Deckgläschen mit einer sterilen Pinzette aus dem Kulturröhrchen herausgeholt, dreimal in steriler physiologischer Kochsalzlösung gewaschen um oberflächlich anhaftende Keime zu entfernen, und mit der bewachsenen Seite nach unten auf eine Endo-Agar Platte gelegt. Mit einer ausgeglühten Platinöse wurde es kräftig über die Oberfläche gezogen, um die Zellen zu zerstören und die phagozytierten lebenden Keime freizusetzen (Bild 4).

Nach Bebrütung der Platten über Nacht bei 37°C konnten die Kolonien ausgezählt werden (Bild 5). Eine Kolonie auf der Platte entspricht einem Keim in der Suspension.

Durch die so bestimmten Keimzahlen konnten folgende Werte ermittelt werden:

1) Die Zahl der insgesamt phagozytierten Keime. Jedes Röhrchen, in dem sich ein Gläschen mit Makrophagen befunden hatte, wurde mit einem entsprechenden Leerwert verglichen. Da die Versuchsbedingungen und die Suspensionen für beide Röhrchen gleich waren, sie sich also nur durch die Anwesenheit von Makrophagen in dem einen Röhrchen unterschieden, muß die Differenz auf Phagozytose zurückzuführen sein.

Ebenso wurde die Phagozytoserate der Keime, die mit einer unerschwelligen Antibiotikadosis inkubiert waren, bestimmt. Hierzu wurde ein Leerwert, in dem die gleiche Antibiotikakonzentration vorhanden war, als Vergleich herangezogen.

2) Die Zahl der phagozytierten toten Bakterien ergab sich aus der Differenz der Gesamtphagozytose und der Zahl der lebend phagozytierten Keime. Auf diese Weise konnte sowohl eine Aussage über die bakterizide Wirkung der Makrophagen als auch über die Phagozytoserate gemacht werden.

Mit Hilfe dieser Werte ließ sich der Einfluß unerschwelliger Antibiotikadosen auf die Zellaktivitäten beobachten.

Ergebnisse:

Als erstes wurde der Einfluss verschiedener Seren auf die Phagozytose untersucht, um für weitere Versuche mit möglichst guten Phagozytoseraten arbeiten zu können.

Wir verwendeten Kaninchenserum und zwar ein Serum mit hohem Antikörpertiter gegen E. Coli O 18 (1:5620) sowie ein Kaninchenserum mit niederem Antikörpertiter (1:20). Daneben wurden zwei Humanseren mit verschieden hohem Antikörpertiter verwendet. In einer dritten Versuchsreihe testeten wir Rinderserum und fötales Kälberserum.

In den Ansätzen wurde Serum in 20%iger Konzentration zugesetzt.

Die Ergebnisse zeigt Tabelle 1. Neben der Koloniezahl (eine Kolonie entspricht einem Keim) sind auch die berechnete Gesamtphagozytose sowie die am Ende eines Versuches noch vorhandene Zahl lebender Keime eingetragen. Um für die einzelnen Versuche untereinander vergleichbare Werte zu erhalten, wurden folgende Prozentzahlen errechnet:

- 1) Der Prozentsatz der lebend phagozytierten Keime bezogen auf die Gesamtphagozytose.
- 2) Der nach Ablauf der Phagozytose in Suspension verbleibende Prozentsatz lebender Keime bezogen auf den Leerwert.

Als Antibiotikum diente Polymyxin B in einer Konzentration von $0,2 \mu\text{g/ml}$. Wie die Keimzahlen der Leerwerte ergab, hatte diese Antibiotikamenge keinen oder nur einen geringen Einfluß auf die Bakterienproliferation. Die Abbildung 1 veranschaulicht den Einfluß verschiedener Seren auf die Phagozytose. Man sieht, daß die Keimzahlen in den Versuchen, bei denen sich Serum mit hohem Antikörpertiter im Inkubationsmedium befand, weit mehr zurückgegangen sind als in den Versuchen mit Serum niederen Antikörpertiters. Da der einzige Unterschied zwischen Leerwert und Teströhrchen die Anwesenheit von Makrophagen in letzterem war, muß der Rückgang in diesen Röhrchen auf Makrophagen, d. h. auf Phagozytose zurückzuführen sein. Wie verschiedene Autoren berichtet haben, ist der Antikörpertiter des im Inkubationsmedium befindlichen Serums von entscheidender Bedeutung für die Phagozytose (20). Während wir mit Serum des wiederholt immunisierten Kaninchens bei Antibiotikagabe eine Phagozytoserate von über 40% finden konnten, zeigt der Versuch, in dem Humanserum niederen Antikörpertiters verwendet wurde, praktisch keine Phagozytose. Bei den Versuchen mit Seren niederen Antikörpertiters wurde gelegentlich eine extrazelluläre Proliferation der Keime beobachtet, die eine genaue Auswertung unübersichtlich machte, da sich zwei Phänomene, nämlich die Phagozytose durch Makrophagen und die Proliferation

der in Suspension befindlichen Keime überlagerten. Dennoch erkennt man aus der Zahl der lebend phagozytierten Keime, wenn sie mit Ergebnissen aus Versuchen mit Immunseren verglichen wird, daß hier nur eine ganz geringe Phagozytose stattgefunden haben kann.

Eine wichtige Beobachtung ist, daß in allen Versuchen die Phagozytoserate bei Anwesenheit unterschwelliger Antibiotikadosen höher war als in Proben ohne Chemotherapeutikum. Die geringere Keimzahl im Überstand des Röhrchens mit Antibiotikum kann nicht als reine Antibiotikawirkung auf die Keime aufgefasst werden, da sie mit einem Leerwert verglichen wurde, in dem sich die gleiche Menge des Mittels befand.

Um dieses Phänomen genauer untersuchen zu können, wurden mehrere Versuche mit einer unterschwelligen Dosis Antibiotikum durchgeführt, und zwar mit Polymyxin in einer Konzentration von 0,2 $\mu\text{g/ml}$ und mit Gentamycin in einer Konzentration von 0,8 $\mu\text{g/ml}$. Die minimale Hemmkonzentration (MHK) für Polymyxin lag bei 0,3 $\mu\text{g/ml}$ und für Gentamycin bei 1,0 $\mu\text{g/ml}$. Es wurde Kaninchenserum mit hohem Antikörpertiter verwendet, da sich gezeigt hatte, daß es die Phagozytose der Makrophagen wirksam unterstützt und offenbar die Keime nur wenig zur Proliferation anregt.

Auf diese Weise wurde der Einfluß von Polymyxin und Gentamycin auf die Makrophagenfunktion in mehreren Versuchen untersucht. Dabei interessierte besonders:

- 1) Wie verhält sich die Phagozytose in einem System mit unterschwelliger Dosis eines Antibiotikums im

Vergleich zu einem solchen ohne Antibiotikum?

2) Makrophagen haben bakterizide Wirkung, das heißt, sie töten aufgenommene Keime mit einer bestimmten Geschwindigkeit ab. Ändert sich bei Anwesenheit unterschwelliger Dosen von Antibiotikum diese Bakterizidie in irgend einer Weise?

3) Wie ist der zeitliche Verlauf dieser Makrophagenaktivität und wie verhält sich die extrazelluläre Keimkonzentration über die Dauer eines Versuches?

Um die ersten zwei Fragen beantworten zu können führten wir einige Versuche in der bereits beschriebenen Weise durch. Die Inkubationszeit betrug wiederum 70 min.

Zur Beantwortung der dritten Frage wurden "Zeitversuche" mit verschiedenen Versuchsröhrchen angesetzt, deren Inkubationszeiten zwischen 0 und 75 min lagen. Auf diese Weise war es möglich, den zeitlichen Verlauf von Keimzahländerungen zu verfolgen. Außerdem wurde eine bestimmte phagozytierte Keimmenge in steriles Medium gebracht und zu verschiedenen festgelegten Zeitpunkten die Zahl der noch lebenden phagozytierten Bakterien untersucht. So war es möglich, die bakterizide Wirkung der Makrophagen isoliert, das heißt ohne den Einfluß weiterer Phagozytose, über einen gewissen Zeitraum zu verfolgen.

In ähnlicher Weise wurden Versuche mit Gentamycin durchgeführt. Hier wurde mit einer Antibiotikakonzentration von 0,8 µg/ml gearbeitet, nachdem in verschiedenen Vorversuchen festgestellt worden war, daß bei dieser

Antibiotikumkonzentration noch keine nennenswerte Hemmung des Bakterienwachstums auftrat.

In Abbildung 2 sind die Ergebnisse der Versuche mit Polymyxin und Gentamycin graphisch dargestellt. Die Höhe der Säulen entspricht der Keimmenge in den Röhrchen, wobei der Leerwert gleich 100 % gesetzt ist. Daneben ist an der Höhe der jeweils anschließenden Säule zu sehen, wieviel Prozent der im Leerwert vorhandenen Keime nach der Phagozytose noch in Suspension waren. Daraus lässt sich die Phagozytoserate errechnen.

Da die Phagozytoseraten von Versuch zu Versuch schwanken und eine Konstanz nur schwer erreichbar ist, stimmen die beiden Leerwerte für Polymyxin und Gentamycin nicht überein. In unseren Versuchen interessierten uns allerdings weniger die absoluten Phagozytosewerte als vielmehr der Einfluß von Antibiotika auf die Phagozytose.

Wie aus dem Diagramm ersichtlich, ist sie in beiden Fällen bei Anwesenheit von Chemotherapeutikum erhöht.

Makrophagen töten aufgenommene Bakterien in einer bestimmten Rate ab. Da wir neben der Gesamtphagozytose auch die Zahl der lebend phagozytierten Keime ermittelt haben, kann die bakterizide Wirkung von Makrophagen verglichen werden, wenn 1. Keime mit einer unterschwelligen Dosis von Antibiotikum und 2. ohne Antibiotikum phagozytiert werden. Wie Abbildung 3 zeigt, ist der Anteil der phagozytierten toten Keime gegenüber den lebend phagozytierten Bakterien bei der Anwesenheit von unterschwelligen Dosen eines Antibiotikums deutlich erhöht. Es muß sich hierbei um eine Makrophagenfunktion handeln

und nicht lediglich um einen Antibiotikumeinfluß auf die Bakterien, da die Leerwerte, auf die alle Werte bezogen wurden, die identische Menge Antibiotikum enthielten.

Aus den Ergebnissen wird ersichtlich, daß durch die Anwesenheit von unterschwelligen Antibiotikakonzentrationen zwei Eigenschaften der Makrophagen, nämlich das Aufnehmen sowie das intrazelluläre Abtöten der Bakterien, unterstützt wird.

In Abbildung 4 ist der zeitliche Verlauf der Phagozytose ohne oder mit unterschwelligen Dosen von Polymyxin und Gentamycin dargestellt. Dazu wurde der Versuch in vierfachem Ansatz durchgeführt und jeweils nach 0, 25, 50 und 75 Minuten ausgewertet. Da die Werte aus Keimzahlen stammen und diese biologischen Schwankungen unterliegen, kann keine perfekte geradlinige Kurve erwartet werden; dennoch geht aus der Graphik hervor, daß die Keimzahlen bei den Versuchen mit Antibiotikum rascher abfallen, das heißt, daß die Phagozytose hier schneller abgelaufen sein muß.

Bei der Untersuchung der bakteriziden Wirkung der Makrophagen über einen bestimmten Zeitraum ergibt sich die Schwierigkeit, daß Phagozytose und das intrazelluläre Abtöten der Keime gleichzeitig ablaufen und so keine getrennte Aussage erlauben. Hat eine Zelle Keime phagozytiert, so werden diese Bakterien mit einer bestimmten Geschwindigkeit abgetötet. Da aber gleichzeitig neue lebende Bakterien aufgenommen werden, wächst die Zahl

der lebend phagozytierten Keime und überschneidet so die abnehmende Tendenz der durch intrazelluläres Abtöten sich verringernden Keimzahl. Um diesen Schwierigkeiten aus dem Wege zu gehen, wurde in diesen Versuchen ein mit Makrophagen besetztes Deckgläschen 40 Minuten lang in eine Bakteriensuspension gegeben, wobei die Makrophagen Bakterien aufnehmen konnten. Danach überführten wir die Gläschen in frisches steriles Medium. Jetzt konnten die Zellen die vorher aufgenommenen Mikroorganismen abtöten, ohne daß gleichzeitig neue Bakterien aufgenommen wurden.

Aus Tabelle 5 und Abbildung 6 geht hervor, daß Keime, die bei Anwesenheit einer unterschwelligen Antibiotikamenge phagozytiert worden sind, stärker und schneller intrazellulär abgetötet werden als solche, die ohne Chemotherapeutikum von den Zellen aufgenommen wurden. In der gleichen Weise konnte die Proliferation der extrazellulären Bakterien während der Inkubationszeit verfolgt werden. Röhrchen ohne Makrophagen, in denen sich nur Bakterien befanden, wurden über verschieden lange Zeit inkubiert; daraufhin wurde jeweils die Zahl der Keime bestimmt. Aus Abbildung 5 wird ersichtlich, daß kaum ein Unterschied besteht zwischen dem Verhalten der Keime bei Anwesenheit von Antibiotikum zu dem von Bakterien in Leerwerten. Ob die Anwesenheit von Makrophagen an diesem Verhalten irgendetwas ändert, wurde

in dieser Arbeit nicht untersucht.

Versuche mit Immunmakrophagen:

Es ist bekannt, daß immunisierte Tiere Mikroorganismen schneller und vermehrt phagozytieren und intrazellulär abtöten als Tiere, die diesem Antigen noch nie ausgesetzt waren. Der Grund dafür wird hauptsächlich in dem Vorhandensein spezifischer Antikörper gesehen, die die Phagozytose von Keimen durch Makrophagen ganz erheblich verstärken. Allerdings ist es zweifelhaft, ob dies der einzige Mechanismus ist, der zur Erklärung dieses Phänomens herangezogen werden kann. Vielmehr wurde oft diskutiert, ob auch die Makrophagen selbst stimuliert, das heißt aktiviert werden können und dann verstärkte Fähigkeit zur Phagozytose und zum intrazellulären Abtöten der Keime zeigen. Dies wurde von verschiedenen Autoren untersucht und beschrieben (21).

Es sollte in einem Versuch untersucht werden, ob in unserer Versuchsanordnung eine verstärkte Phagozytose und vermehrte bakterizide Wirkung der sogenannten Immunmakrophagen nachgewiesen werden kann und ob auch hier unterschwellige Dosen Antibiotikum die Funktionen dieser Zellen zu beeinflussen vermögen.

Zur Gewinnung der Makrophagen dienten zwei Kaninchen. Das eine Tier war über längere Zeit gegen den Bakterienstamm E. Coli O 18 immunisiert und in regelmäßigen Abständen mit dem gleichen Antigen "geboostert" worden. Der Titer gegen den Bakterienstamm betrug 1:5620.

Daneben wurde ein nicht immunisiertes Tier verwendet, das einen Antikörpertiter von 1: 80 gegen den Coli-stamm O 18 aufwies.

Aus beiden Tieren wurden Milzmakrophagen gewonnen und diese in ihrer Wirkung miteinander verglichen. Da nur ein einziger solcher Versuch durchgeführt wurde, kann keine genaue Aussage über das Verhalten der aktivierten Makrophagen gemacht werden.

Es sei nur soviel gesagt, daß wiederum bei Anwesenheit von Antibiotikum eine größere Menge Keime phagozytiert wurde als im Vergleichwert ohne Chemotherapeutikum. Allerdings konnten wir nicht feststellen, daß die Makrophagen des immunisierten Tieres in vitro eine größere Zahl von Mikroorganismen phagozytierten als die Zellen des nicht immunisierten Kaninchens. Auch bei der Betrachtung der bakteriziden Wirkung der Zellen fällt verstärktes intrazelluläres Abtöten bei Anwesenheit von Antibiotikum auf. Es zeigte sich eine deutlich stärkere Bakterizidie der Makrophagen des immunisierten Tieres gegenüber den Zellen des Vergleichstieres. Offenbar sind aktivierte Makrophagen besser befähigt, intrazellulär Keime abzutöten als nicht stimulierte Zellen.

Durch diese Versuche konnte auch gezeigt werden, daß Milzmakrophagen für die Untersuchung der Phagozytose in vitro geeignet sind.

Diskussion:

Schon lange sind Makrophagen und das Phänomen der Phagozytose bekannt. Zum ersten Mal berichtet 1899 Metchnikoff von "Makrophagen aus Leber, Milz, Lymphknoten und dem Peritoneum, die fremde Proteine und kleine Teile begierig aufnehmen" (22).

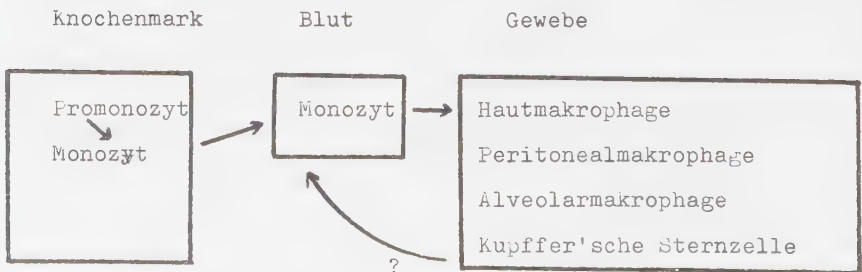
Makrophagen können auf Grund ihrer besonderen Eigenschaften leicht identifiziert und isoliert werden.

Die Wichtigsten davon sind(4):

- 1) Sie setzen sich auf Glas ab und bilden dort fest-sitzende Zellfilme.
- 2) Durch Bewegungen der Membran können sie Plasma-fortsätze ausstülpfen.
- 3) Sie können nach Inkubation mit Antiseren Antikörper adsorbieren.
- 4) Sie haben die Fähigkeit, durch Phagozytose und Pinozytose fremde Partikel aufzunehmen und sich einzuverleiben.

Über den Ursprung der Makrophagen gab es vor allem zwei Auffassungen; nach der einen stammen mononukleäre Phagozyten von Lymphozyten ab, der anderen zufolge haben sie eine eigene Zellentwicklung. Heute ist, besonders durch Versuche mit radioaktivem Thymidin, die eigenständige Entwicklung der mononukleären Zellen bekannt (14). Die Zellen entstehen als Promonozyten im Knochenmark, entwickeln sich dann zu Monozyten, die

in das Blut abgegeben werden. Durch den Blutstrom gelangen sie in das Gewebe, wo sie durch Zunahme der Enzymaktivitäten eine starke Fähigkeit zur Phagozytose entwickeln. Jetzt nennt man sie Makrophagen. Sie kommen überall im Körper vor, gehäuft besiedeln sie die Organe Peritoneum, Leber, Milz, Lunge. Die Lebensdauer der mononukleären Phagozyten beträgt wahrscheinlich einige Monate. Darüber, auf welche Weise sie abgebaut und ausgeschieden werden, gibt es bis jetzt nur Vermutungen, denenzufolge sie als Alveolarmakrophagen in die Trachea abgegeben werden, oder etwa, daß sie die Mukosa des Darmes durchbrechen und in das Darmlumen gelangen. Außerdem wird diskutiert, ob die Gewebsmakrophagen in die Blutbahn zurückgelangen, und auf dies Weise zu anderen Körperstellen transportiert werden. Eindeutige Ergebnisse liegen noch nicht vor. Zusammenfassend soll die Entwicklung der Makrophagen an folgendem Schema gezeigt werden (14):



Lässt man Mäuse-Peritonealmakrophagen einige Zeit auf Glas sedimentieren, so kann man sie gut morphologisch untersuchen. Die Zellmembran stülpt Fortsätze aus, und nach einigen Stunden hat sich die ganze Zelle auf dem Glas ausgebreitet. Im Phasenkontrastmikroskop erkennt man den nierenförmigen Zellkern und die zahlreichen um ihn gelagerten Vakuolen. Morphologisch auffallend sind beim differenzierten Makrophagen die große Anzahl perinukleärer Einschlüsse, die als Lysosomen identifiziert wurden (10). Sie enthalten die für die Makrophagenfunktion wichtigen Enzyme, welche bei Bedarf an die durch Phagozytose entstandenen Vakuolen abgegeben werden.

Eine der hervorstechendsten Eigenschaften der Makrophagen ist ihre Fähigkeit zur Endozytose, dazu, Partikel aus der äußeren Umwelt aufzunehmen. Dabei unterscheidet man Phagozytose und Pinozytose. Pinozytose ist die Aufnahme von kleinen Tröpfchen, die sich an der Außenseite der Zellmembran bilden, während es sich bei der Phagozytose um die Aufnahme von lichtmikroskopisch sichtbaren Partikeln handelt. Bei der Phagozytose lagert sich das entsprechende Teilchen zunächst an die Oberfläche der Makrophagenmembran an. Wie die Zelle den Partikel festhält, ist nicht genau bekannt, wahrscheinlich spielen dabei Antikörper, die sich mit dem Antigen verbinden, eine Rolle. Nach der Aufnahme der Teilchen werden diese entlang bestimmter mitochondrienreicher Spuren von der Peripherie durch die Pseudopodien in das zentrale Zytoplasma transportiert. Dort verschmelzen sie mit Lysosomen, deren Enzyme sie aufnehmen.

Diese Enzyme bewirken den Abbau der phagozytierten Teilchen (10). Auf diese Weise werden im Körper fremde und gefährliche Stoffe aufgenommen und abgebaut. Aufgenommene Bakterien werden dabei abgetötet.

Schon lange ist bekannt, daß zur Phagozytose bestimmte Serumbestandteile notwendig sind. Die Bedeutung von Serum für die Phagozytose wurde von mehreren Autoren betont (20,34). Wie auch in eigenen Versuchen gezeigt werden konnte, hat besonders Immunserum einen stark fördernden Einfluß auf die Phagozytose; Antikörper gegen die zu phagozytierende Substanz unterstützen die Phagozytose so wirksam, daß vorgeschlagen wurde, die Phagozytose durch Makrophagen als besonders empfindlichen Antikörpertest einzuführen (29). Es wird diskutiert, ob diese Wirkung auf zytophile Antikörper zurückzuführen ist, die von den Makrophagen durch bestimmte Rezeptoren festgehalten werden (19).

Die Auslösung einer Immunantwort wird durch mindestens zwei Zelltypen veranlasst, nämlich Makrophagen und Lymphozyten (19). Mit Sicherheit produzieren Makrophagen keine Antikörper (27).

Die stark phagozytierenden Granulozyten bauen innerhalb kurzer Zeit das gesamte aufgenommene Material bis zu Aminosäuren ab (19). Demgegenüber wurde bei Makrophagen beobachtet, daß etwa 90% des ursprünglich aufgenommenen Antigens katabolisiert wurde, während die übrigen 10% in einen Zellteil gebracht wurden, der der Lysosomenfraktion nicht zugänglich war, in dem sie also vor den

abbauenden Enzymen geschützt waren (10, 19). Verschiedene Versuche zeigten, daß Makrophagen möglicherweise eine Information, die eine RNA sein könnte, an Lymphozyten übergeben (6, 12, 15). So konnte aus Makrophagen, die mit Jod 131 markiertes Haemocyanin phagozytiert hatten, eine RNA isoliert werden, die, in normale Mäuse injiziert, die Produktion von Haemocyanin - Antikörpern verursachte. Diese RNA enthielt Spuren von Radioaktivität, die darauf hinwiesen, daß Antigen mit dieser Nukleinsäure vergesellschaftet war (3). Für die Auslösung einer Immunantwort ist offenbar nur ein kleiner Teil des Antigens verantwortlich, der in den Makrophagen in einen Zellteil gebracht wird, in dem er vor dem Abbau durch Lysosomen geschützt ist. Auf diese Weise kann das Antigen längere Zeit über wirksam bleiben und Lymphozyten zur Antikörperproduktion stimulieren (19). Eindeutige Ergebnisse über die Überträgersubstanz liegen heute noch nicht vor.

Makrophagen haben also eine vielfache Wirkung. Zunächst einmal helfen sie mit, fremde Stoffe zu phagozytieren und intrazellulär abzubauen. Gleichzeitig spielen sie eine wichtige Rolle bei der Auslösung der Immunantwort, indem sie einen Teil des Antigens speichern und es für die Stimulierung der Lymphozyten verarbeiten. In Makrophagen kann das Antigen über längere Zeit wirksam bleiben und eine trophische Wirkung auf lymphatische Zellen ausüben (19).

An Hand der durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß sowohl die Aufnahme als auch das intrazelluläre Abtöten von Mikroorganismen durch Makrophagen bei Anwesenheit von Antibiotika wie Polymyxin und Gentamycin gesteigert wird. Dies äußerte sich in einer vermehrten Phagozytoserate und einer schnelleren und verstärkten bakteriziden Aktivität der Zellen bei Zusatz unterschwelliger Dosen von Antibiotikum im Vergleich zu Leerwerten ohne Chemotherapeutikum. Es konnte nachgewiesen werden, daß Polymyxin und Gentamycin in unterschwelliger Konzentration zelluläre Phagozytosevorgänge, die bei der Infektabwehr des Körpers eine wichtige Rolle spielen, günstig zu beeinflussen vermögen.

In früheren Arbeiten untersuchten andere Autoren (17, 20) den möglichen Einfluß von Antibiotika auf intrazellulär gelagerte Bakterien und fanden, daß diese Mikroorganismen vor einem Angriff der Chemotherapeutika geschützt sind. Dosen, die in vitro gegen den betreffenden Keim bakterizid wirken, erwiesen sich als unwirksam gegen intrazelluläre Mikroorganismen. Aus diesen Beobachtungen schloß man, daß das Antibiotikum nicht in die Zellen eindringen kann. Diese Ergebnisse widersprechen unseren Beobachtungen nicht, da in jenen Versuchen das Antibiotikum erst zugesetzt wurde, nachdem die Zellen die Keime bereits aufgenommen hatten. Auf diese Weise wurden die noch extrazellulären Keime abgetötet. In unserer Versuchsanordnung dagegen wurde das Chemotherapeutikum bereits

vor Beginn der Phagozytose in das Kulturmedium eingegeben. Es sei noch einmal darauf hingewiesen, daß die Antibiotikumkonzentrationen, die zur Anwendung kamen, zu gering waren, um die verwendeten Keime zu hemmen, wie sich aus den Verlaufskontrollen der Bakterienzahlen während der Versuchszeit zeigte. Nur bei Anwesenheit von Makrophagen zeigten sie eine Wirkung.

Als Erklärungen unserer Beobachtungen müssen zwei Überlegungen diskutiert werden:

1) Das betreffende Antibiotikum wirkt auf die Zellen, deren Aktivitäten es verstärkt. Daraus könnte eine erhöhte Phagozytoserate und verstärkte Bakterizidie resultieren. Cline konnte in einer Untersuchung eines Systems aus Makrophagen und Listerien eindeutig feststellen, daß ein als B 663 bezeichnetes Präparat, bei dem es sich jedoch nicht um ein Antibiotikum handelte, über eine Enzymaktivierung verstärkte Makrophagenfunktionen bewirkte (7). Ob dieser Wirkungsmechanismus auch für die therapeutisch verwendeten Antibiotika gültig ist, bleibt fraglich, besonders auch deshalb, weil in anderen Arbeiten festgestellt wurde, daß intrazelluläre Keime vor der bakteriziden Wirkung von Chemotherapeutika geschützt bleiben (17). Bestünde ein Einfluß auf die Makrophagenfunktion, so hätte ein verstärktes intrazelluläres Abtöten der Mikroorganismen in den Systemen beobachtet werden müssen, bei denen sich Antibiotikum im Kulturmedium befand. Im Rahmen unserer Arbeit wurde ein möglicher Einfluß von Antibiotika auf die Zellen selbst nicht untersucht.

2) Das vor uns verwendete Antibiotikum wirkt auf die Keime. Die in unseren Versuchen zur Anwendung kommenden Dosen reichen zwar für eine keimhemmende Wirkung nicht aus, sie können aber möglicherweise wirksam genug sein, um die Keime vorzuschädigen ohne sie abzutöten. Die auf diese Weise "geschwächten" Mikroorganismen werden von den Makrophagen leichter aufgenommen und abgebaut.

Es kann hier nicht mit Sicherheit entschieden werden, welche der angeführten Überlegungen den Synergismus zwischen Antibiotika und Makrophagen bei der Abwehr von Mikroorganismen erklärt oder ob er auf einer anderen Ursache beruht. Wahrscheinlich spielt sich ein ähnlicher Vorgang auch im Organismus bei der Chemotherapie ab. Unsere in vitro Beobachtungen einer verstärkten Phagozytose bei Antibiotikuzusatz könnten zur Erklärung einiger klinischen Beobachtungen dienen, die auf ein Zusammenwirken von Antibiotika und körpereigenen Abwehrmechanismen bei der Infektabwehr hinweisen.

Im Knochen können wegen der geringen Durchblutung auch bei höchsten verabreichten Dosen nur unterschwellige Antibiotikakonzentrationen erreicht werden, die in vitro keinen oder nur sehr geringen Einfluß auf die Bakterien haben; dennoch führt auch eine solche Therapie oft zum Erfolg (20). Möglicherweise verstärken die unterschwelligen Antibiotikakonzentrationen dabei indirekt die Aktivität der körpereigenen Abwehrmechanismen.

Andererseits gibt es Beispiele dafür, daß beim Fehlen oder bei nur ungenügender Funktion der Makrophagen

Abwehr die Therapie bei Infektionen schwierig ist, trotz in vitro wirksamer Chemotherapeutika. So erliegen Kinder bei Immundefizienzen meist trotz Antibiotikatherapie Infektionen, die bei Gesunden leicht überstanden werden (2). Bei Kindern, denen wegen Hydrocephalus ein Spitz-Holter-Ventil eingesetzt werden musste, kommt es häufig zu einer bakteriellen Besiedlung der Prothese, die mit Antibiotika meist nicht erfolgreich angegangen werden kann, sondern das Entfernen des infizierten Ventils erforderlich macht (18).

Das Versagen der Chemotherapie in diesen Fällen könnte auf das Fehlen oder das nur unzureichende Funktionieren der körpereigenen Abwehrmechanismen zurückzuführen sein.

In unserer Versuchsanordnung mussten wir einige mögliche Fehlerquellen berücksichtigen.

Die Phagozytoserate, die wir mit den Mäuse-Peritonealmakrophagen erzielten, waren relativ gering. Andere Autoren konnten oft in ähnlichen Versuchen höhere Zahlen phagozytierter Mikroorganismen angeben(8,33). Zwar kam es uns weniger auf die absoluten Zahlen aufgenommener Keime als vielmehr auf den Einfluß von Antibiotika auf diese Makrophagenfunktion an, jedoch hätte eine deutlichere Phagozytose möglicherweise noch eindrucksvollere Ergebnisse zeigen können.

Um die Zahl der phagozytierten aber noch lebenden Keime zu bestimmen, strichen wir das Deckgläschen mit dem

Makrophagenfilm auf eine Endo-Agar Platte aus (siehe Versuchsanordnung). Mackaness wies in einer Arbeit darauf hin, daß ein Abwaschen der Gläschen unzureichend sei, um alle anhaftenden aber nicht wirklich phagozytierten Keime zu entfernen (20). Wir spülten die Deckgläschen dreimal und erneuerten die Waschflüssigkeit im Laufe eines Versuches öfters; dennoch ist es möglich, daß nicht immer alle extrazellulären Bakterien entfernt werden konnten. Eine weitere Schwierigkeit, die in der Versuchsanordnung begründet liegt, ist die Bestimmung der Phagozytoserate. Wir ermittelten sie aus der Differenz der Keimzahlen aus Systemen mit und ohne Zusatz phagozytierender Zellen (siehe Methode). Eine Veränderung der Keimzahlen kann aber nicht nur durch Phagozytose, sondern auch durch Proliferation der Bakterien zustande kommen. Allerdings ist anzunehmen, daß eine Proliferation im Kontrollwert mit Makrophagen und im Vergleichwert ohne diese Zellen gleichstark in Erscheinung tritt. Die Differenz der Keimzahlen aus diesen beiden Werten muß also auf Phagozytose zurückzuführen sein. Wir glauben daher, daß trotz der angeführten möglichen Fehlerquellen die von uns verwendete Methode geeignet war, um die Phagozytose und das intrazelluläre Abtöten von Bakterien durch Makrophagen zu untersuchen. Makrophagen stellen den afferenten Teil des Immunsystems dar. Um den Einfluß von Antibiotika auf die gesamte körpereigene Abwehr beurteilen zu können, müssen weitere

Untersuchungen durchgeführt werden, so etwa über das Verhalten von Lymphozyten und über das Zusammenwirken von immunokompetenten Zellen bei der Anwesenheit von Antibiotika. Der Einfluss anderer Chemotherapeutika muß untersucht werden. In einer Arbeit konnte gezeigt werden, daß die bakterizide Wirkung von Serumbestandteilen durch unterschwellige Antibiotikadosen beträchtlich verstärkt wird (1).

Diese Beobachtungen weisen darauf hin, daß die Chemotherapie nicht lediglich in einer bakteriziden oder bakteriostatischen Wirkung auf die Mikroorganismen begründet liegt, sondern daß sie in einer Beeinflussung der körpereigenen Abwehrmechanismen und einem Zusammenwirken vieler Faktoren gesehen werden muß.

Eine Erforschung dieser Zusammenhänge verhilft uns zu einem besseren Verständnis über die Funktion von Antibiotika im Organismus und gibt uns die Möglichkeit einer wirksamen und sinnvollen Chemotherapie.

Zusammenfassung:

Bei Peritonealmakrophagen von Mäusen untersuchten wir die Phagozytoserate und das intrazelluläre Abtöten von *E. Coli* O 18 in vitro unter dem Einfluß der Antibiotika Polymyxin B und Gentamycin in unterschwelligen Dosen. Dabei konnte eine erhöhte Phagozytoserate und ein verstärktes und beschleunigtes intrazelluläres Abtöten der aufgenommenen Mikroorganismen beobachtet werden. Klinische Beobachtungen bei bestimmten Erkrankungen des Abwehrsystems (Immundefizienzen) haben gezeigt, daß Antibiotika trotz voll sensibler Bakterien bei einem Mangel oder Fehlen der körpereigenen Abwehr schlecht oder überhaupt nicht wirksam sind.

Die Tatsache, daß Makrophagen Bakterien, die mit Antibiotikum in Kontakt gekommen waren ohne dabei selbst gehemmt worden zu sein, vermehrt phagozytieren und intrazellulär abtöten, weist darauf hin, daß bei der antimikrobiellen Therapie der unterstützenden Wirkung der körpereigenen Abwehr eine wesentliche Bedeutung zukommt.

Infus 3 verschiedener Seren auf die Phagocytose

L	R	L-R	C	$\frac{L \times 100}{R}$	Versuch
bestand im Leerwert	Überstand im Kontrollwert	berechnete Phagocytose	intrazell. lebende Keime	% Phagocytose	
1400 1500	800 1400	600 400	60 200	43% 22%	AB K 79
1700 2300	1700 2600	- -	40 90	- -	AB K 80
1100 1300	1100 1000	500 300	250 270	31% 23%	AB R S
2200 2200	1600 2800	600 -	20 30	27% -	AB F C S
3100 3400	2300 3000	800 400	60 80	26% 12%	AB H S 1
2200 2200	2200 2300	- -	30 20	- -	AB H S 2

E. 79: Kaninchenserum H A Titer gegen E. coli 0 18 1: 5620
 F. 80: Kaninchenserum H A Titer gegen E. coli 0 18 1: 80
 S: Rinderserum H A Titer gegen E. coli 0 18 1: 320
 S: foetales Kalberserum H A Titer gegen E. coli 0 18 1: 80
 : 0,2 µg Polymyxin / ml.
 1: Humanserum HA Titer gegen E. coli 018 1: 5620
 2: Humanserum Ha Titer gegen E. coli 018 1:20

Tabelle 2

Einfluß unterschwelliger Dosen von Polymyxin und Gentamycin
auf die Phagozytose

Einsezt	L	R	L-R	C	Cx100 L-R	Lx100 R	Versuch
	Überstand im Leerwert	Überstand im Kontrollwert	berechnete Phagozytose	intrazell. leb. Keime	% lebend phag. Keime	% phag.	
1500	1500	700	800	130	16%	53%	Poly
1500	1500	1000	500	180	36%	33%	-
2300	1400	700	700	160	23%	50%	Poly
2300	1500	900	600	350	58%	40%	-
2800	3100	2400	700	60	9%	23%	Genta
2800	3400	3000	400	80	20%	12%	-
1200	1200	900	300	70	23%	25%	Genta
1300	1500	1300	200	80	40%	18%	-

Poly: 0,2 µg Polymyxin/ml im Inkubationsmedium

Genta: 0,8 µg Gentamycin /ml im Inkubationsmedium

Die Zahlen geben die Anzahl der Keime im Inkubationsmedium nach 70 min
Phagozytose an

Tabelle 3

zeitlicher Verlauf der Phagozytose und der bakteriziden Wirkung
der Makrophagen unter dem Einfluß von Polymyxin und Gentamycin

L	R	L-R	C	$\frac{Cx100}{L-R}$	$\frac{Lx100}{R}$	Zeit
1200	1240	20	1	-	98%	0 min
1160	1240	40	18	45%	97%	25 min
1220	1260	-	28	-	100%	50 min
1520	1250	270	80	-	82%	75 min
1090	1200	-	3	-	110%	0 min
1130	1030	100	12	12%	91%	25 min
1120	1020	200	20	10%	84%	50 min
1600	1240	360	48	13%	77%	75 min
1280	1160	120	1	1%	91%	0 min
1060	1090	-	16	-	103%	25 min
1170	1080	90	42	50%	93%	50 min
1220	900	320	66	20%	74%	75 min

L = Überstand im Leerwert
 R = Überstand im Kontrollwert
 L-R = berechnete Phagozytose
 C = intrazell. lebende Keime

$\frac{Cx100}{L-R}$ = lebende phag. keime in %
 $\frac{Lx100}{R}$ = Überstand Kontrollwert in %

Tabelle 4

Untersuchung von Immunmakrophagen

L	R	L-R	C	$\frac{Cx100}{L-R}$	$\frac{Lx100}{R}$	
2500	2100	400	20	5%	84%	AB
2500	2400	100	10	10%	96%	—
2400	2000	400	90	22%	84%	AB
2500	2300	200	90	45%	92%	—

L = Überstand im Leerwert

 $\frac{Cx100}{L-R}$ = leb. phag. Keime

R = Überstand im Kontrollwert

L-R = berechnete Phagozytose

C = intrazell. lebende Keime

AB = 0,2 µg/ml Polymyxin

 $\frac{Lx100}{R}$ = Überstand Kontrollwert

In der ersten Spalte sind die Werte aus den Versuchen mit Immunmakrophagen, in der zweiten die Vergleichswerte von "normalen" Makrophagen aufgeführt

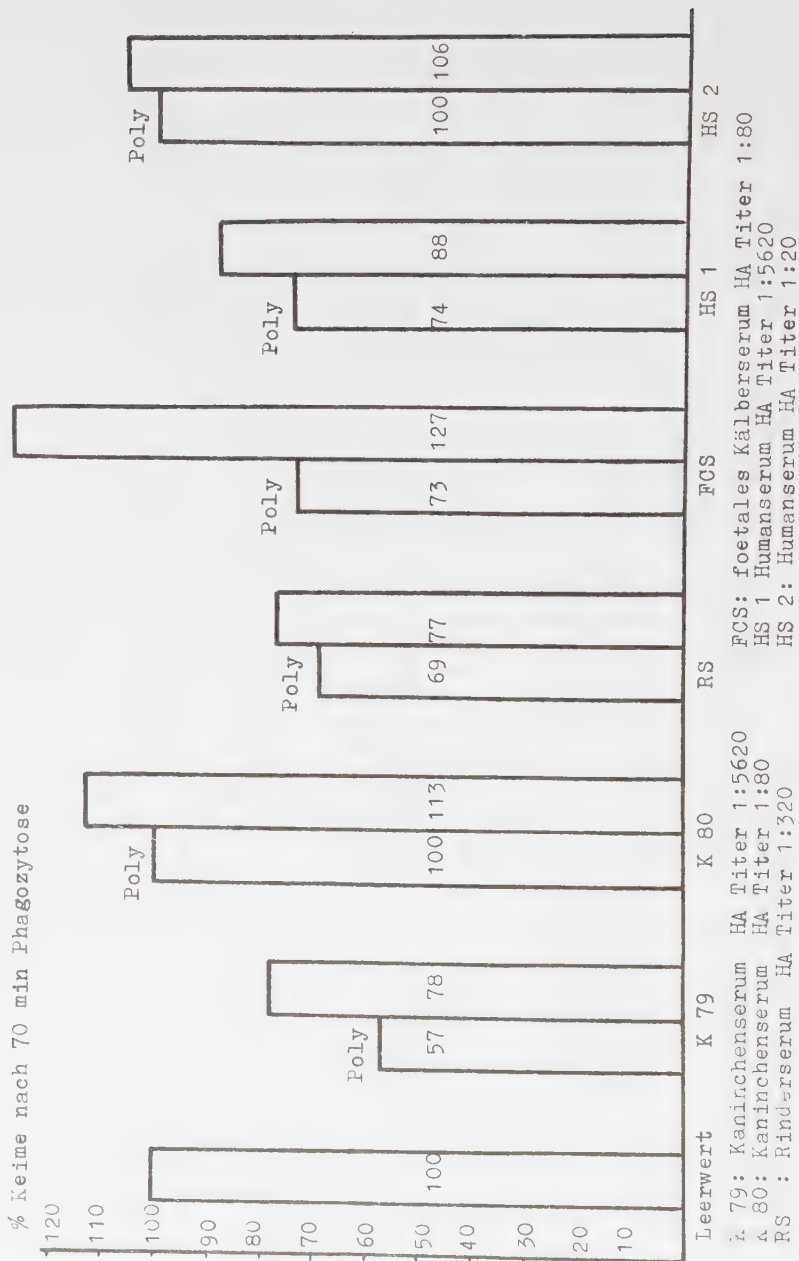
Tabelle 5

Intrazelluläres Abtöten einer bestimmten
phagozytierten Keimmenge

Zeit min	berechnete Phagozytose L - R	intrazell. leb. Keime C	% lebend phag. Keime $\frac{C \times 100}{L-R}$
Versuch mit 0,2 μ g Polymyxin			
0	2300	510	27%
10		275	12%
18		265	11%
26		288	12%
34		256	11%
Versuch ohne Antibiotikum			
0	-	525	100%
10		466	88%
18		450	86%
26		413	79%
34		320	61%

Abbildung 1

Einfluß verschiedener Seren auf die Phagozytose



Einfluß unterschwelliger Dosen von Polymyxin und Gentamycin auf
die Phagozytose

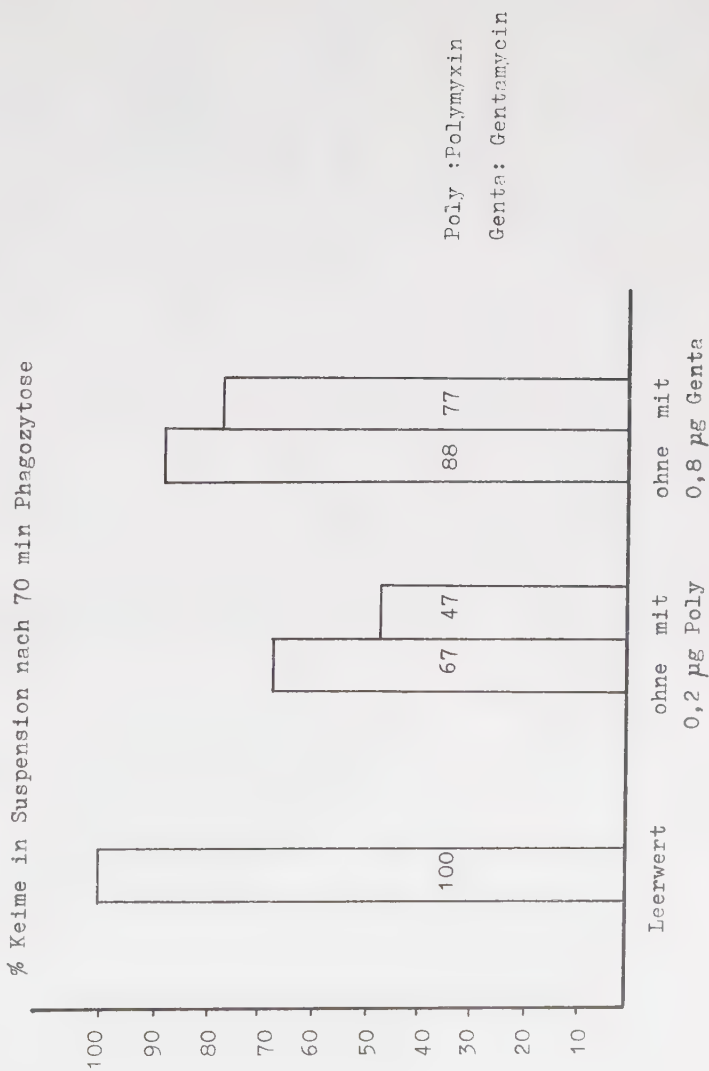


Abbildung 3

Bakterizide Wirkung von Makrophagen bei Versuchen mit und ohne
unterschwellige Dosen von Antibiotikum

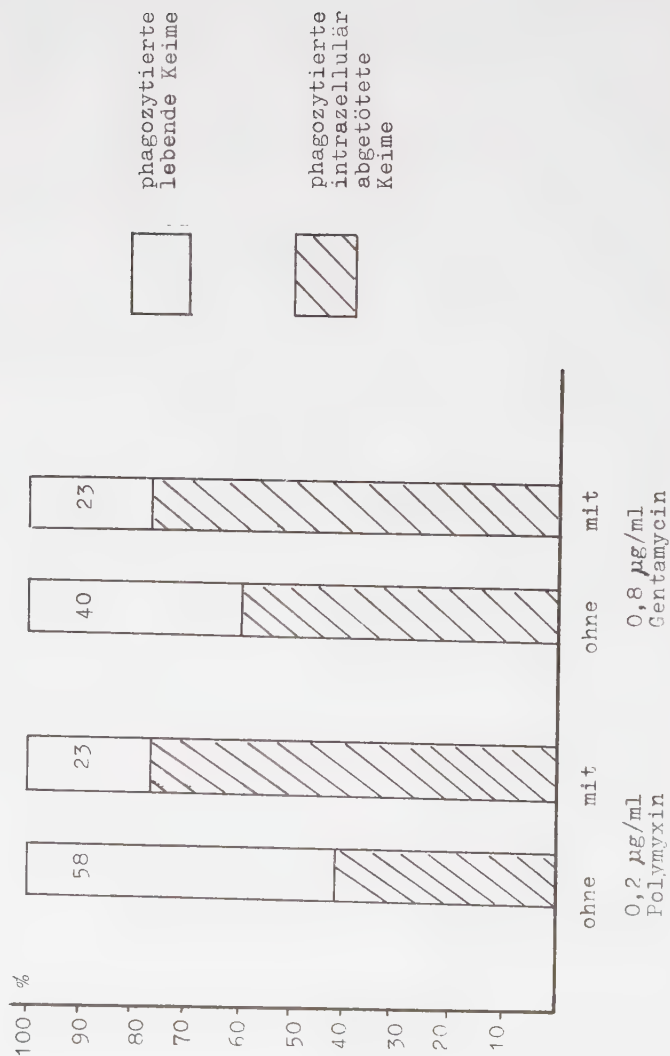


Abbildung 4

Abnahme der extrazellulären Keimkonzentration durch Phagozytose

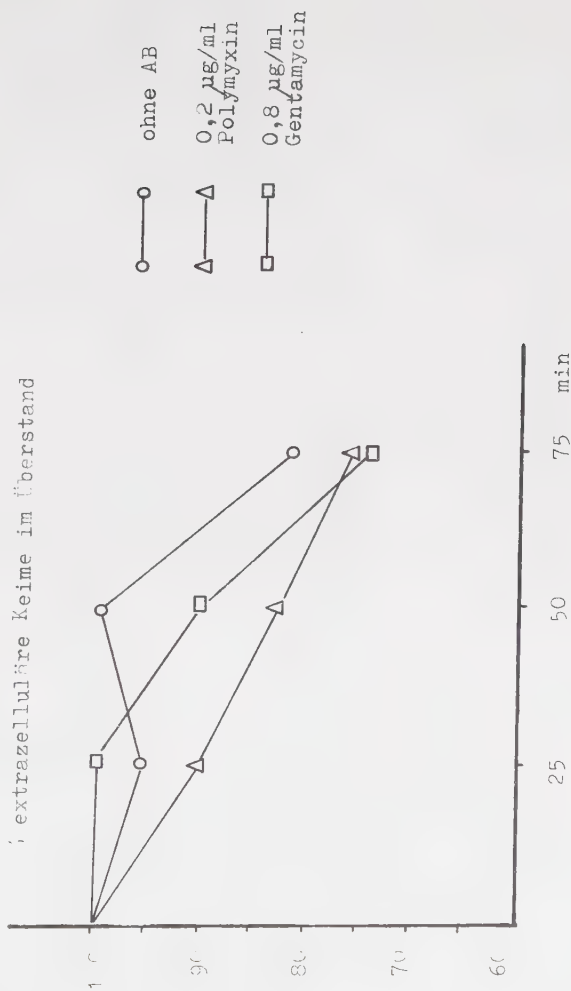


Abbildung 5

Bakterienproliferation während eines Versuches

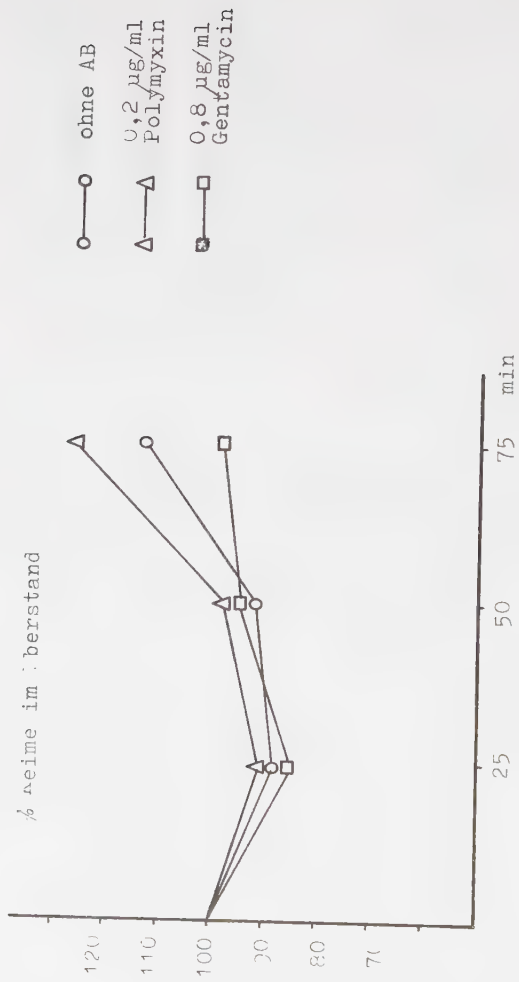


Abbildung 6

Intrazelluläres Abtöten einer bestimmten phagozytierten Keimmenge

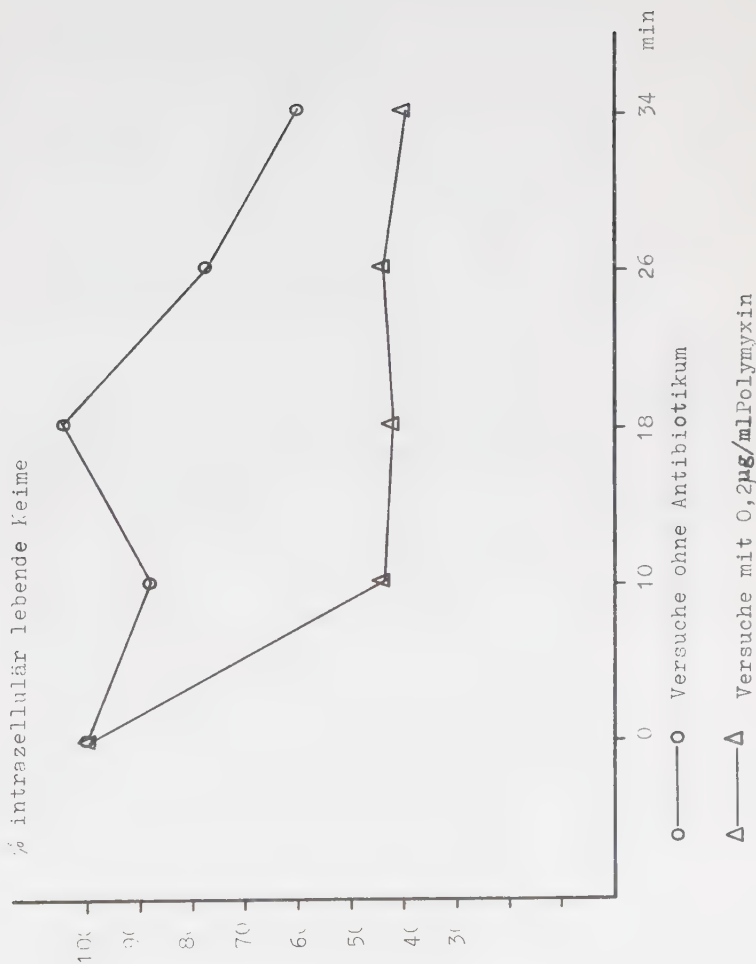


Abbildung 7

Phagozytose bei Immunmakrophagen

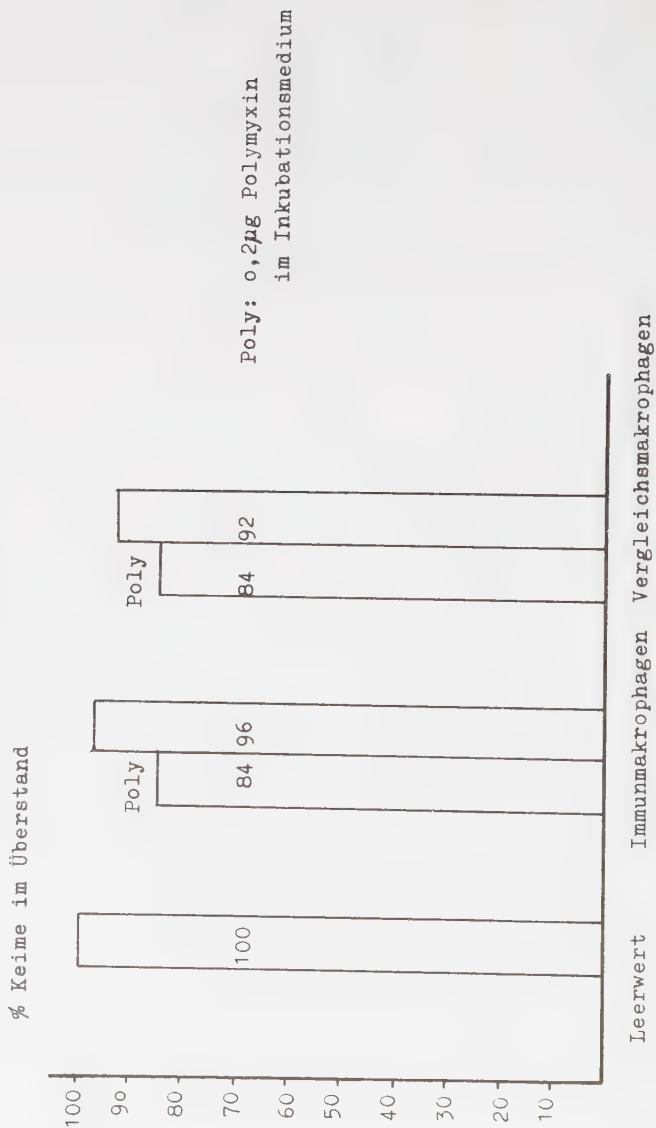


Abbildung 8

Antiserische Wirkung von Immun konjugaten

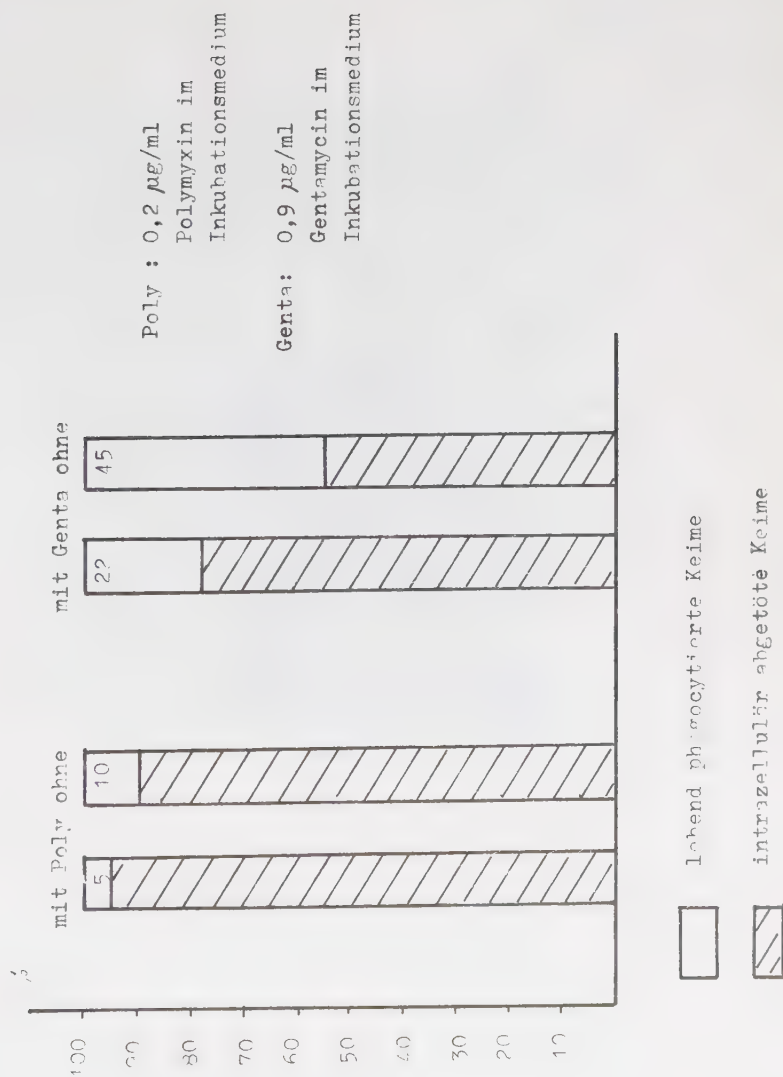
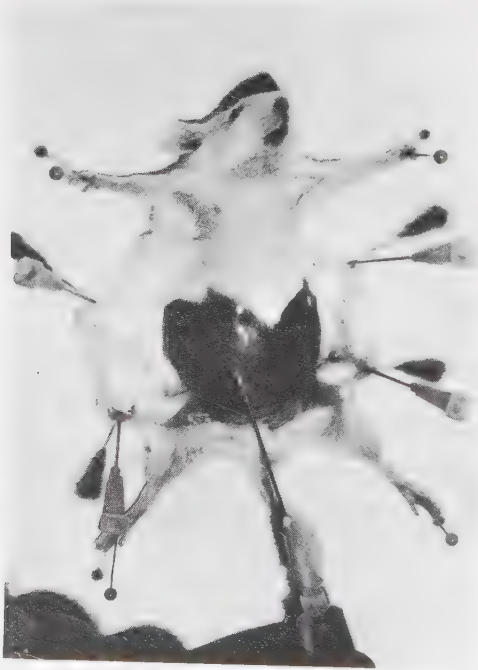
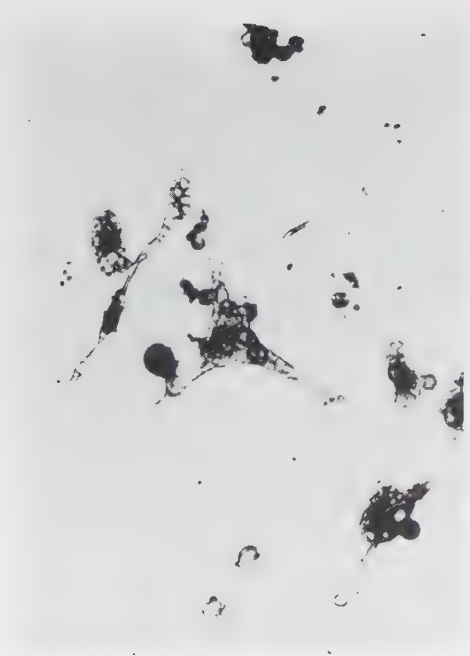


Bild 1



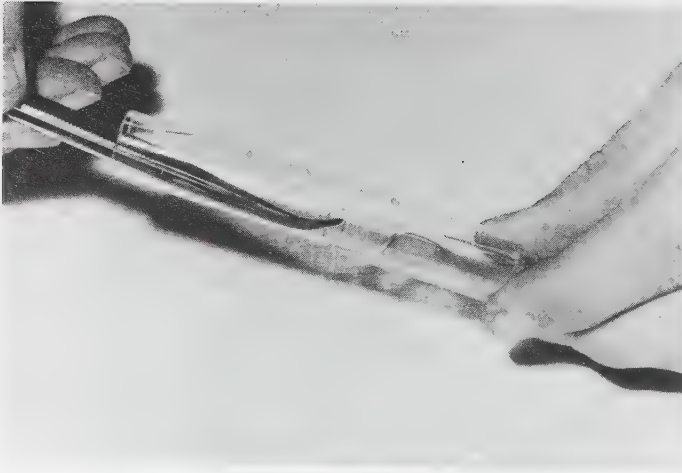
Gewinnung von Mäuse - Peritonealmakrophagen

Bild 2



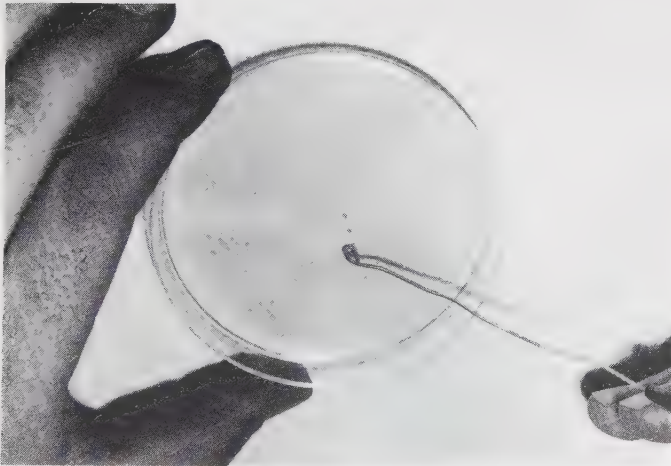
Auf Deckgläschen sedimentierte Makrophagen

Bild 3



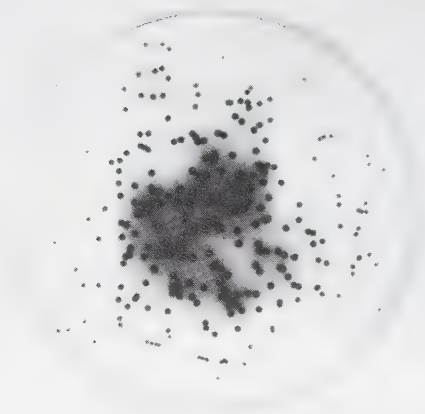
Herausnehmen eines Deckgläschens aus dem Kulturröhrchen

Bild 4



Ausstreichen eines Deckgläschens auf einer
Endo-Agar-Platte

Bild 5



Kolonien von E. Coli O 18 auf einer Endo-Agar-Platte

Literaturverzeichnis:

- 1) Adam, D. 1970. Studies on the influence of endogeneous defence mechanisms on the antimicrobial effect of chemotherapeutic agents. I. The influence of serum constituents on the in vitro effect of Gentamicin and Polymyxin. Int. J. Clin. Pharmacol. 3
- 2) Adam, D. 1971. Infektionen bei Immundefizienzen
In: Antibiotika und Transfusionstherapie in Pädiatrie und Kinderchirurgie. Urban und Schwarzenberg
- 3) Bishop, D. C., and A. A. Gottlieb 1970.
Macrophages, RNAs and the immun response.
Curr. Top. Mikrobiol. Immunol. 51: 1 - 26
- 4) Bennet, W. E., and Z. A. Cohn 1966. The isolation and selected properties of blood monocytes. J. exp. Med. 123: 145
- 5) Bolt, W. und H. Venroth 1970. Nicht tuberkulöse Erkrankungen der Lunge und der Pleura. In: Gross Jahn Schölmerich Lehrbuch der Inneren Medizin S. 441
F. V. Schottauer Verlag Stuttgart 2. Auflage

- 6) Braun, W., and L. J. Lasky 1967. Antibody formation in newborn mice initiated through adult macrophages. Fed. Proc. 26: 642
- 7) Cline, M. J. 1970. Mechanism of killing of a facultative intrazellular bacterium by human macrophages. Production of super-macrophages by redox agents. XIII. International Congress of Hematology
- 8) Degré, M. 1969. Phagocytic and bactericidal activities of peritoneal and alveolar macrophages from mice. J. med. Microbiol. 2: 353 - 357
- 9) Douglas, S. D. and H. H. Fudenberg 1969. Ig G - receptor: an immunologic marker for characterisation of mononuclear cells. Immunology 17: 7
- 10) Ehrenreich, B. A., and Z. A. Cohn 1967. Uptake and digestion of iodinated human serum albumin by macrophages in vitro. J. exp. Med. 126: 941 - 958
- 11) Fischer, H., W. Ax und H. Malchow 1969. Die Immunfabrik. Klin. Wschr. 47: 1019 - 1025

- 12) Fishman, M. 1961. Antibody formation in vitro
J. exp. Med. 114: 837 - 856
- 13) Friedman, A. 1954. An evaluation of chlor-
amphenicol therapy in typhoid children.
Pediatrics 24: 28 - 37
- 14) van Furth, R. 1970. Origin and kinetics
of monocytes and macrophages.
Semin. hematol. 7: 125 - 141
- 15) Gallily, R., and M. Feldman 1967. The role
of macrophages in the induction of antibody
in X - irradiated animals.
Immunology 12: 196 - 206
- 16) Günther, O. 1969. Einführung in die Immun-
biologie S. 22. Hippokrates, Stuttgart
- 17) Holmes, B., P. G. Quie, D. B. Windhorst,
B. Pollara, and R. A. Good 1966.
Protection of phagocytized bacteria from
the killing action of antibiotics.
Nature 210: 1131 - 1132

- 18) Holt, R. 1971. Coagulase negative staphylococci as opportunist pathogens.
Arzneimittel Forschung Jahrgang 21 Nr. 3
- 19) Huber, H., und H. H. Fudenberg 1969.
Die immunologische Funktion von Monozyten
und Makrophagen. Klin. Wschr. 47: 1061-1068
- 20) Mackaness, G. B. 1960. The phagocytosis
and inactivation of staphylococci by
macrophages of normal rabbits.
J. exp. Med. 112: 35 - 53
- 21) Mackaness, G. B. 1970. The mechanism of
macrophage activation. In: Stuard Mudd
Infectious Agents and Host Reactions
p. 61 - 75. W. B. Saunders Company
Philadelphia - London - Toronto
- 22) Metchnikoff, E. 1899. Etudes sur la
résorption des cellules.
Ann. Inst. Past. 13: 737 - 769

- 23) Neter, E., L. F. Bertram, D. A. Zak, M. R. Murdock, and C. E. Arbesman 1952. Studies on hemagglutination and hemolysis by *Escherichia coli* antisera. J. exp. Med. 36: 1 - 15
- 24) North, R. J. 1970. Endocytosis. Semin. hematol. 7: 161 - 171
- 25) Oberzill, W. 1967. Mikrobiologische Analytik S. 157 - 160. Hans Carl Nürnberg
- 26) Pichelmaier, H., A. Jabour, H. H. Edel, B. Altmeyer, H. Döbelstein, H. J. Gurland, R. Müller 1968. Die Verpflanzung von Leichen- nieren beim Menschen. Bericht über 20 Fälle. Münchner med. Wschr. 110: 491 - 498
- 27) Pribnow, J. F. ,and M. S. Silverman 1967. studies on the radiosensitive phase of the primary antibody response in rabbits. J. Immunol. 98: 225 - 229
- 28) Rowley, D. 1958. Bactericidal activity of macrophages in vitro against *Escherichia coli*. Nature 181: 1738 - 1739

- 29) Rowley, D. 1962. Phagocytosis. Adv. Imm. 2: 241
- 30) Saha, A., J. S. Carvey, and D. H. Campbell 1964
The physicochemical characterisation of the
ribonucleic acid antigen complex persisting
in the liver of immunized rabbits.
Arch. Biochem. 105: 179 - 192
- 31) Seelmann, K. und H. Neumann 1954. Moderne
Scharlachbehandlung und Antistreptolysin-
reaktion. Dtsch. med. Wschr. 79: 1825-1828
- 32) Walter, M. und L. Heilmeyer 1969. Antibiotika
Fibel. a) S.439-455, b) S. 423-433,
c) S. 116. Georg Thime, Stuttgart 3. Auflage
- 33) Whitby, J. L., and D. Rowly 1959.
The role of macrophages in the elimination
of bacteria from the mouse peritoneum.
Brit. J. exp. Pathol. 40: 358 - 370

Lebenslauf

Am 21. Januar 1947 wurde ich als Sohn des Dipl. Landwirts Dr. Immo Philipp und seiner Frau Brigitte, geborene Bender, in Meersburg am Bodensee geboren. Unsere Familie lebt in Überlingen, wo ich 1953 in die Volksschule kam und 1966 das Abitur ablegte. Das Schuljahr 1963/64 verbrachte ich in Horseheads im amerikanischen Bundesstaat New York. Nach zwölfmonatigem Wehrdienst begann ich im Sommer 1967 das Medizinstudium. Ich studierte an den Universitäten München, Marseille und Freiburg/Brsg., wo ich im Dezember 1973 das medizinische Staatsexamen ablegte.

